

## **X CONGRESO ARGENTINO DE MASTOLOGÍA**

### **LA FIRMA DE EXPRESIÓN GÉNICA COMO PREDICCIÓN DE LA SUPERVIVENCIA EN CÁNCER DE MAMA Y EL ROL DEL TRATAMIENTO ADYUVANTE**

**Marc van de Vijver**

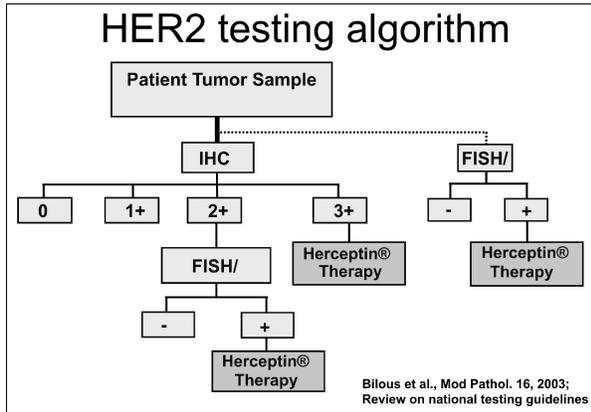
Mediante las observaciones en el microscopio podemos hacer el diagnóstico de cáncer mamario. Quiero destacar también que podemos tomar las células en una aspiración con aguja fina o hacer una biopsia percutánea y extraer ADN o ARN de esas células. También en la fase prequirúrgica, en el estudio de estas pacientes con cáncer de mama es posible incorporar pruebas genéticas con ARN o ADN aislado de las células de una aspiración con aguja fina o con una biopsia percutánea. Después de hacer el diagnóstico de cáncer mamario y de iniciar el tratamiento, el cual consiste en resección quirúrgica del tumor, cosa que se puede hacer con mastectomía o con terapia conservadora de la mama. Es importante que después de concluida la operación la muestra llegue a patología rápido, y no en formol, para que el patólogo pueda de inmediato trabajar con esa muestra. Porque insisto, muchas de las pruebas genéticas dependen de la disponibilidad de material tumoral congelado, como también les mostraré la posibilidad de hacer pruebas con tejido con formol y en parafina, pero también puede ser que las pruebas del futuro se tengan que hacer con material congelado. Cuando llega la muestra de preservación de la mama, hay que marcar los sectores límites para examinarlos bien. Es importante que los márgenes estén libres de tumores, en la tera-

pia conservadora de la mama. Después se puede cortar rebanadas de 0,5 cm de espesor desde los márgenes de resección.

Estos cortes de 0,5 cm son realizados por el patólogo con el tumor fresco, sin fijación. La parte del tumor se puede sacar para congelarlo sin afectar los márgenes de la resección. De este trozo de tumor se puede extraer ARN o ADN. Gran parte de las investigaciones hechas en los últimos veinte o treinta años del estudio de las alteraciones genéticas en cáncer de mama y los perfiles génicos, se han hecho aprovechando tejido congelado obtenido con este método; es decir, tomando una muestra quirúrgica fresca, seccionada por el patólogo y congelando parte de ese tumor para hacer las investigaciones genéticas.

Cuando estudiamos el cáncer mamario, estudiamos el diámetro del tumor y esto se hace en la muestra de la resección; estudiamos el grado histológico (grado 1, 2 o 3). Creo que también en los años siguientes seguiremos haciendo esto. Creo que el diámetro tumoral, el grado histológico y el estado de los ganglios seguirán siendo factores de pronóstico importantes.

También estudiamos la situación de los receptores de estrógeno con inmunohistoquímica. En la actualidad es uno de los factores de predicción más importantes. Esto predice la facti-

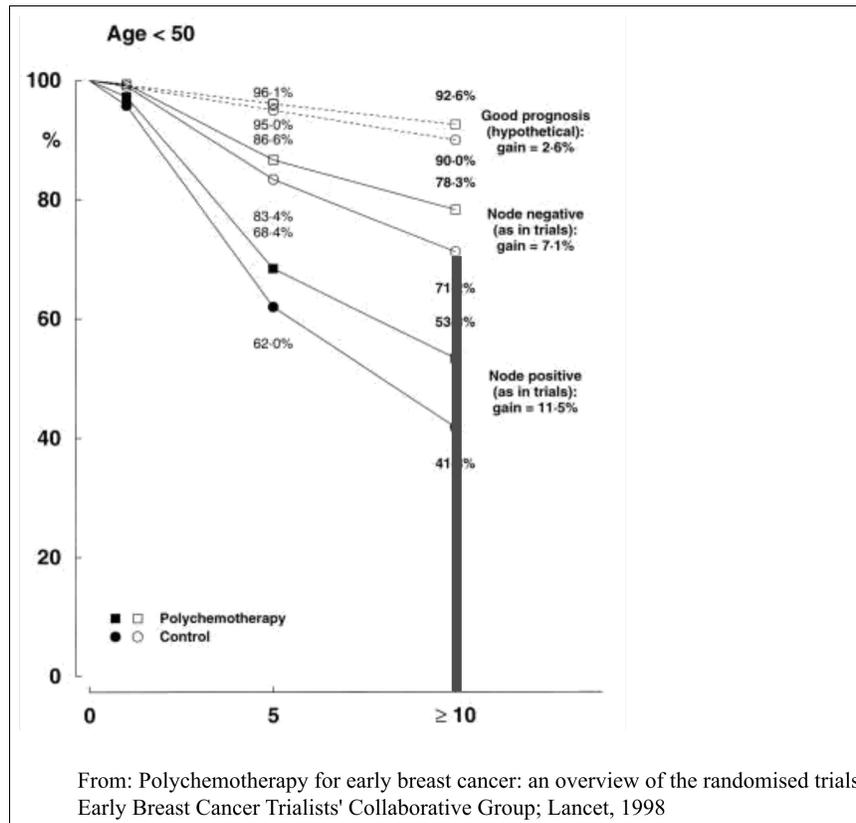


Cuadro 1

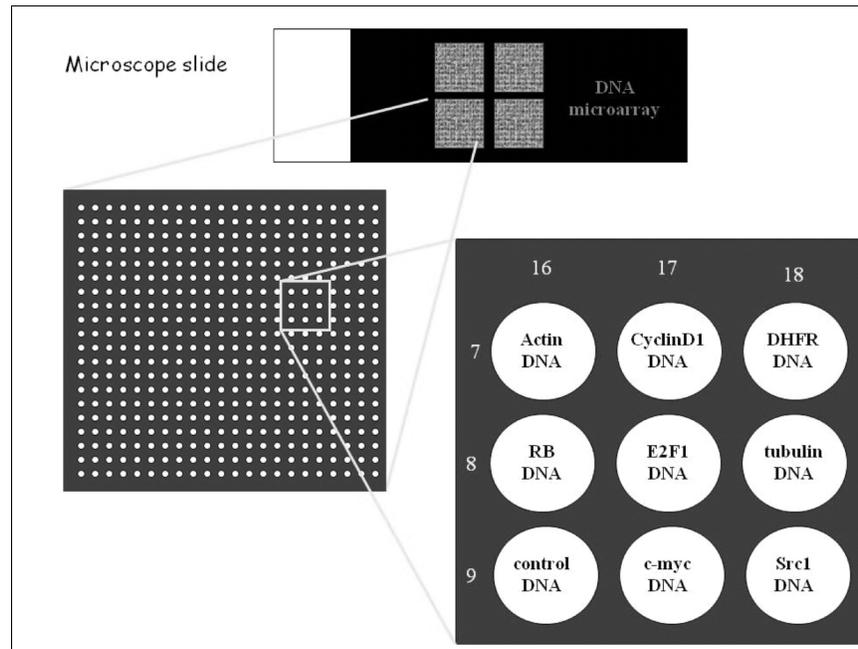
bilidad de que un tumor responda a la terapia hormonal. Así que la situación de receptores de estrógeno es evaluada. La situación del HER2 se estudia por inmunohistoquímica e hibridación in situ.

Las pruebas de predicción para el cáncer mamario actualmente son la situación de los receptores de estrógeno y la situación de HER2 (Cuadro 1).

En el Cuadro 2 se ilustra por qué necesitamos más factores de pronóstico y de predicción. Éste es un metaanálisis de ensayos clínicos que han examinado si la quimioterapia sistémica adyuvante se traduce en mejor sobrevida. La curva inferior corresponde a pacientes con cáncer mamario, con metástasis linfáticas, que no recibieron quimioterapia adyuvante. Se muestra también la curva correspondiente a pacientes con cáncer mamario sin metástasis ganglionares, que no recibieron quimioterapia adyuvante. El metaanálisis y muchos ensayos individuales han demostrado que si se agrega la quimioterapia, la radioterapia, a la cirugía del tumor primario esto mejora la sobrevida. Así que para cáncer ma-



Cuadro 2



Cuadro 3

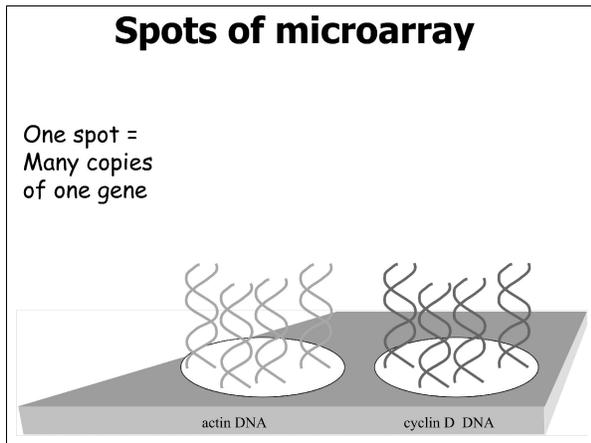
mario con ganglios positivos, la sobrevida con quimioterapia se incrementa más del 10% que sin quimioterapia. La diferencia en sobrevida global si agregamos quimioterapia, se traduce en una mejoría en la sobrevida para pacientes con cáncer de mama en todo el mundo. El problema es que hay que tratar a las pacientes con cáncer de mama con ganglios negativos, ¿el 70% hubiera sobrevivido también sin quimioterapia? Identificar a esas pacientes (las que no necesitan quimioterapia para tener una buena sobrevida), es uno de los desafíos más importantes en el campo de la investigación para factores de pronóstico.

Los factores de pronóstico y predicción que usamos hoy son: estado de los ganglios, tamaño, grado histológico, ausencia o presencia de invasión linfática; después usamos los factores de predicción ER, PR y HER 2; y ahora estamos comenzando a usar perfiles de expresión génica. De esto hablaré durante el resto de mi presentación.

Los interrogantes que tenemos que enfrentar son: ¿quién debe ser tratada con tratamiento ad-

yuvante sistémico para mejorar la sobrevida? Esto siempre en pacientes con cáncer mamario primario, operables. Cuando el pronóstico no es tan bueno, hay una razón para tratarlas con terapia sistémica adyuvante. La próxima pregunta es, ¿qué tratamientos hay que hacer? Terapia hormonal, hay varias opciones; quimioterapia también hay varias opciones; y terapia orientada puntualmente con un *target*. Hay factores que ayudan a predecir qué importantes son las probabilidades de una metástasis de un tumor. Hay que analizar factores capaces de predecir la respuesta a terapias individuales. Por ejemplo, ver si un tumor va a responder a ciclofosfamida, antraciclina o tamoxifeno. Esas preguntas las tenemos que responder si queremos tratar en forma óptima a las pacientes con cáncer de mama.

Cuando observamos el tumor, hay muchas propiedades que son el resultado del patrón de expresión de todas las proteínas que existen en esas células tumorales. Obviamente que la forma óptima de caracterizar un tumor sería estudiar el patrón de expresión de todas las proteínas, incluyendo las modificaciones por fosforilado de



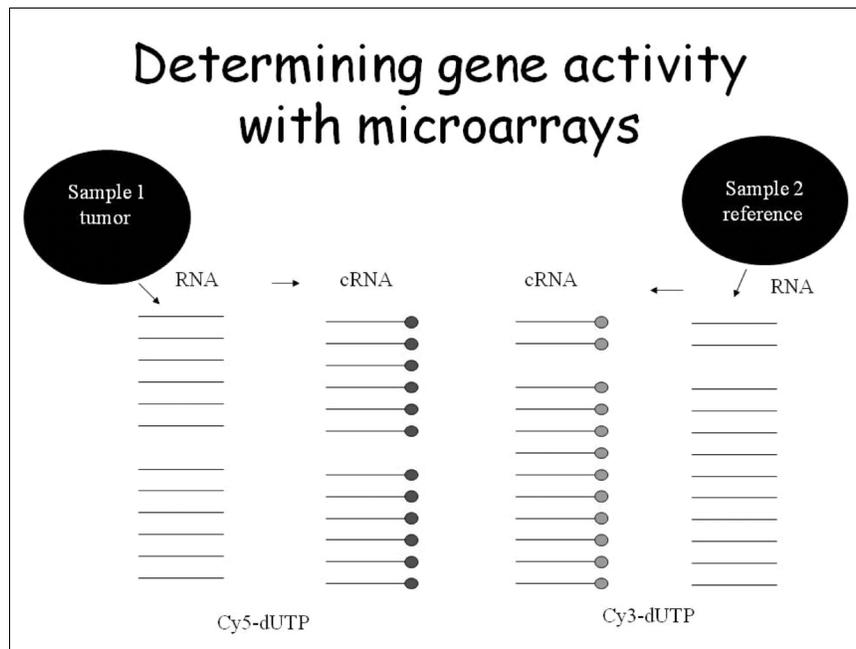
**Cuadro 4**

esas proteínas, porque las propiedades de estas proteínas en forma conjunta dictaminan cómo se va a comportar el tumor. Hablan de sus vías, de sus mecanismos de crecimiento, de los mecanismos de resistencia a la quimioterapia, con lo cual se arma el tumor. Pero es muy difícil analizar las proteínas con tanta precisión. Actualmente se está investigando y las cosas van a cambiar

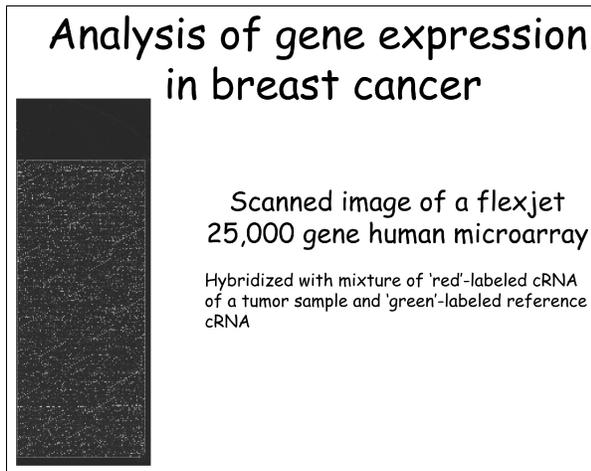
con los años, pero en la actualidad es muy difícil justipreciar detalladamente todas las importantes proteínas que existen en una de estas células. Quizá en diez años podamos mirar los genes que se están expresando y podamos ver todos los genes del genoma humano. Hace diez años, el proyecto del genoma humano se concluyó, así que conocemos todos los genes que codifican proteínas en el genoma humano. Para cada uno de esos genes, podemos fabricar un trozo del gen, una sonda, y lo podemos conectar a una superficie sólida. En el Cuadro 3 se muestra un portaobjetos de vidrio, como hay otras superficies sólidas para hacer este perfilado de la expresión génica. En el magnificado, cada punto en este portaobjetos representa un gen. En este portaobjetos podemos colocar 22.000 genes, fácilmente.

Cada punto consiste en muchas copias del mismo gen adheridas a esa superficie sólida (Cuadro 4). Así que un punto son muchas copias de un gen específico.

Podemos tomar un trozo de material tumo-



**Cuadro 5**

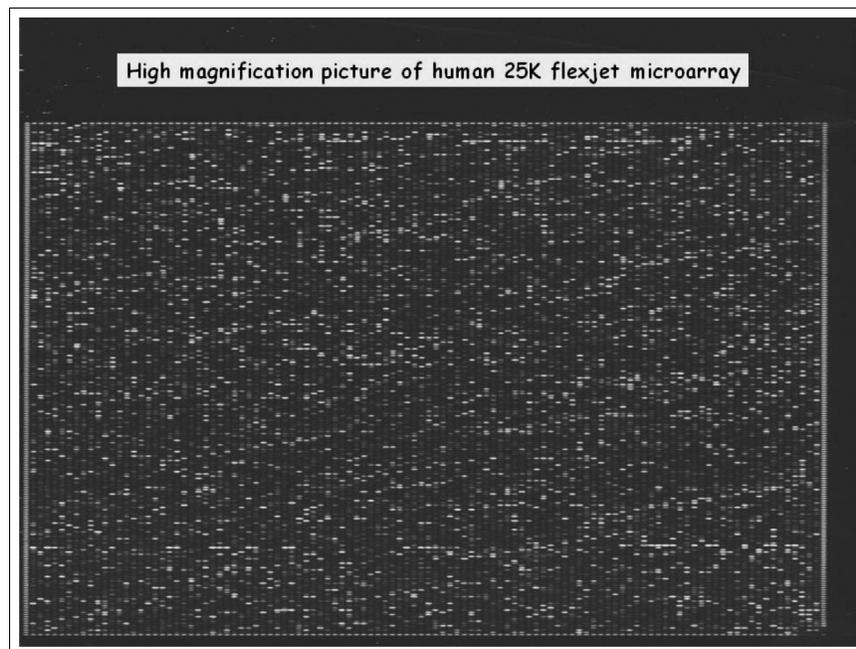


Cuadro 6

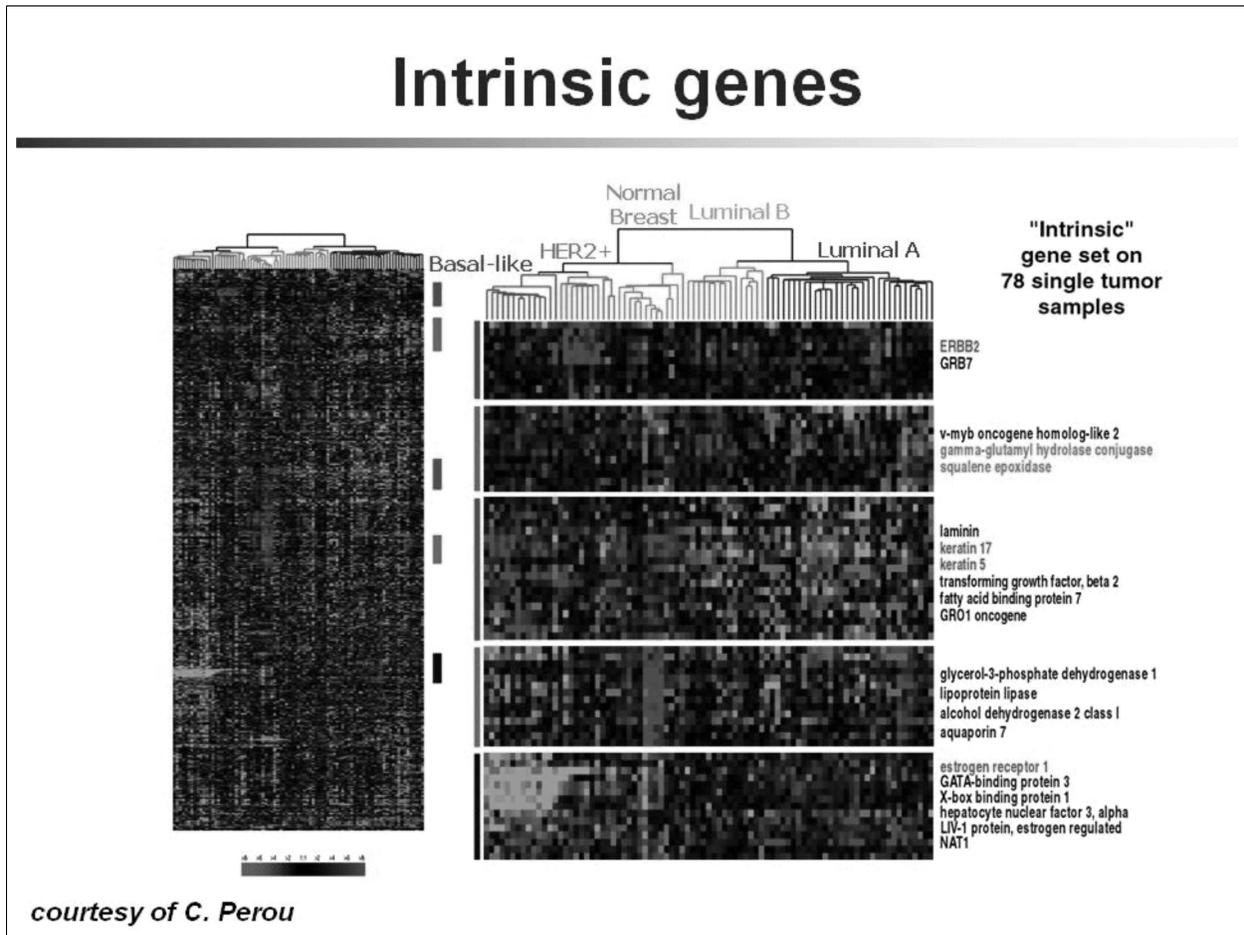
ral congelado; para hacer un buen perfilado de la expresión génica necesitamos material congelado (Cuadro 5). Podemos extraer ARN de tejido parafinado, pero la calidad no es tan satisfactoria como el que se aísla en tejidos congelados. Podemos aislar el ARN del tumor y se puede rotular el ARN con tinción fluorescente.

Cada trozo de ARN tumoral se va a marcar en rojo. Para la superficie sólida que les mostré, ese portaobjetos con 22.000 genes, también necesitamos ARN de una fuente de referencia y el ARN de referencia se marca en verde. El próximo paso es tomar esta combinación de ARN tumoral y de referencia, e hibridando la superficie sólida con todas esas copias, el conjunto de 22.000 genes, cuando se expresa altos niveles en el tumor el gen, el ARN rojo se liga a ese punto específico, pero no abre ARN de referencia en ese mismo sitio. Si el ARN en el tumor se expresa a bajos niveles, no habrá color rojo, sólo veremos verde.

Lo que obtenemos entonces es un conjunto con aspecto del Cuadro 6, que es el portaobjetos y contiene resultados de hibridación de un tumor. Así que en un experimento que se puede hacer en dos días, conoceremos el nivel de expresión de todos los 22.000 genes en el genoma humano; en consecuencia, también conocemos aproximadamente cuál es el nivel de expresión proteica para todos estos genes. Por ejemplo, si



Cuadro 7



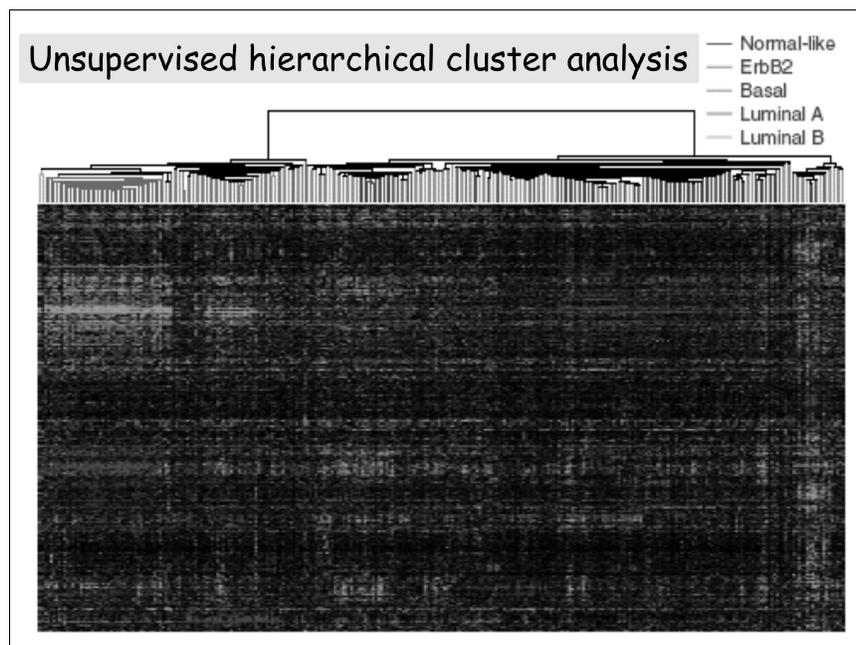
Cuadro 8

hacemos un experimento con ARN hepático, el ARN codifica enzimas hepáticas expresadas en los niveles. Es el mismo ARN aislado de un tumor. Podemos mirar todas estas expresiones génicas en un experimento, en consecuencia, también podemos ver el patrón de expresión de genes importantes en el crecimiento de células tumorales o el mecanismo por el cual un tumor forma metástasis a distancia.

En el Cuadro 7 se muestra con mayor aumento, y cada punto rojo representa una alta expresión de un gen. Hemos trabajado mucho en una serie de 295 cánceres mamarios. Si tomamos una serie grande de tumores, como en nuestra serie, tenemos 295 cánceres de mama. Tenemos información clínica para esos 295 tu-

more: el tamaño del tumor, el grado histológico, las curvas de sobrevivencia; la pregunta es si el tumor hizo o no metástasis. Se conocerán 25.000 puntos de datos para cada tumor, y esto representa el patrón de expresión génica de ese tumor.

Hay que analizar todos estos datos ahora, se puede hacer con clasificación no supervisada o supervisada. Estas estadísticas no son nuevas, no son demasiado complejas para un especialista en estadísticas o para un programa de computación, que maneja sin dificultad estos 295 tumores con 22.000 o más puntos de datos cada uno. Así que se hacen análisis de cúmulos no supervisados (un pionero fue el Dr. C. Perou, de la Universidad de Stanford), tendrán un pa-



Cuadro 9

trón con el aspecto del Cuadro 8. Cada columna es un tumor, cada fila es un gen; o sea, aproximadamente 15 tumores. Hay un juego de genes que expresan altos niveles en los tumores y este mismo juego de genes se expresan en bajos niveles en otros tumores. Así que hay un patrón de expresión de genes en los tumores. Mirando estos diagramas, observaron que había un cúmulo muy cerrado de tumores, con un patrón de expresión muy parecido de tipo basal (es el nombre que le dieron), porque en esos tumores se expresan las queratinas mioepiteliales (las basales, si quieren), a altos niveles. Los otros niveles determinaron los luminales.

Muchos grupos en todo el mundo, incluso nuestro grupo, hemos reiterado este experimento. A la izquierda del Cuadro 9 se ven los tumores tipo basal. En cada segmento hecho con cáncer de mama, existe este grupo muy reproducible de tumores de tipo basal. También están los tumores tipo HER2, este grupo está enriquecido para la sobreexpresión del gen HER2 y está en los tumores de tipo luminal que expresan el tipo de queratina luminal. Las queratinas se ex-

presan en células epiteliales que están en la parte luminal de los conductos y lóbulos de la mama normal. Estos tumores basales no son reproducibles, pero en los tumores HER2, por ejemplo, si usamos análisis del cúmulo no supervisados, están enriquecidos para HER2, pero no son idénticos. Si quieren conocer si un tumor HER2 es positivo, hay que hacer pruebas HER2, y no perfiles de expresión génica. También el tipo de tumor luminal A, y luminal B no son muy estables y reproducibles como subgrupo de estos cánceres de mama. En la investigación, que es muy importante por el grupo, Stanford ha destacado el hecho de que existen estos subgrupos de cáncer mamario.

Pero para estudiar estos subgrupos no necesitamos perfiles de expresión génica. Se pueden hacer estudios de receptores de estrógeno, de progestágenos y HER2 con inmunohistoquímica combinada con hibridación in situ por las pruebas HER2. Lo que se ve entonces es que un sistema de tipo basal es prácticamente el mismo grupo que los llamados cánceres mamarios triple negativo y tienen un 15% de todos los cánceres

### Classification based on immunohistochemistry

- ER+/PR+/HER2- 40%
- ER+/PR-/HER2- 30%
- ER+/PR+/HER2+ 3%
- ER+/PR-/HER2+ 2%
- ER-/PR-/HER2+ 10%
- ER-/PR-/HER2- 15%

Cuadro 10

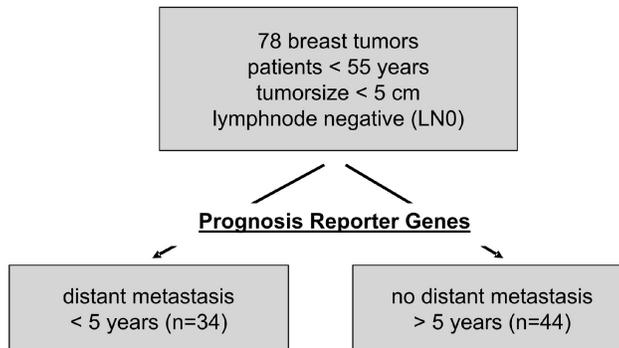
mamarios. Otro 15% de los cánceres mamarios serían HER2 positivos, y de esos HER2 positivos, el 10% son negativos para receptores de progestágeno y estrógeno. El 5% son para estrógenos y HER2 positivos (Cuadro 10). El grupo de cáncer más grande que conocemos son para estrógeno positivo y HER2 negativo. Así que estos son los subgrupos principales de cáncer de mama. Los perfiles de pronóstico están identificando el pronóstico en receptores de estrógeno

positivos.

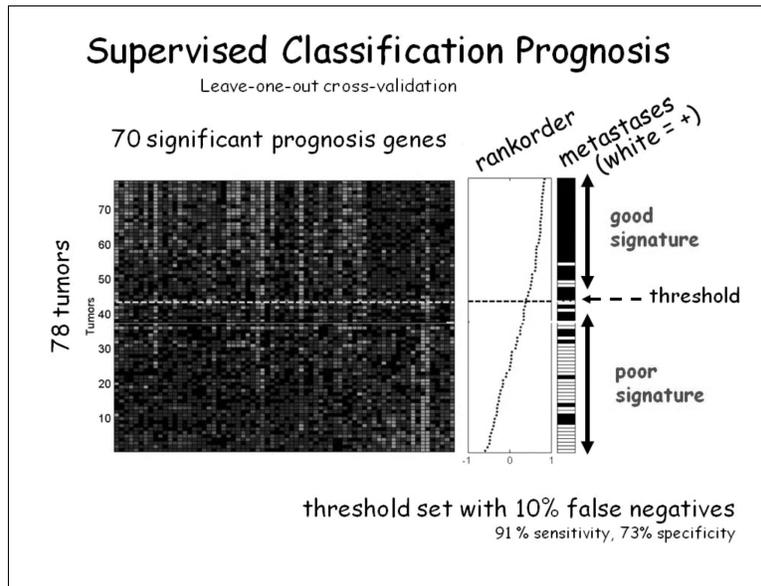
Pero si se quiere identificar nuevos factores de pronóstico, la técnica de clasificación supervisada da resultados muy superiores (Cuadro 11). ¿Cómo lo hicimos? Tomamos 78 cánceres mamarios del banco de tejido congelado, todas pacientes de menos de 55 años de edad, tomamos el ARN de esos tumores. El perfil de expresión génica se hizo después, porque hubo seguimiento para cada una de esas pacientes. Sabíamos que 34 pacientes habían desarrollado metástasis a distancia en 5 años y 44 pacientes no sufrieron metástasis a distancia durante por lo menos 5 años. El próximo paso estadístico fue preguntarle a la computadora cuál, de los 22.000 genes del ser humano, está correlacionado con metástasis o no metástasis. Es muy sencillo, simplemente tomamos cada gen y vemos si la expresión de ese gen es más elevada en el grupo metastásico, comparado con el grupo sin metástasis.

Repetimos esto 22.000 veces y encontramos 70 genes que difieren en su expresión entre tumores que hacen metástasis a distancia y los que no la hacen. En la parte superior del Cuadro 12 se ven varias pacientes que no sufrieron metástasis a distancia (se puede ver a la izquierda). Hay muchos genes que se expresan a bajos ni-

### Supervised Classification for Prognosis



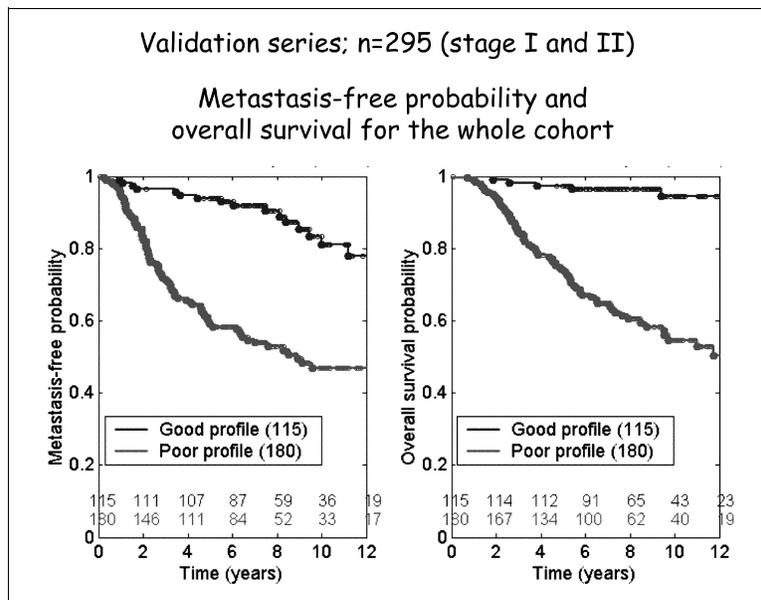
Cuadro 11



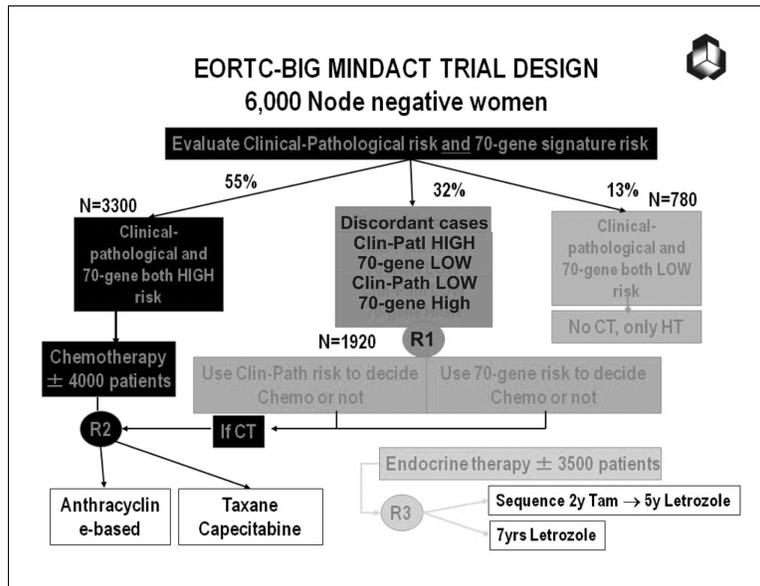
**Cuadro 12**

veles y pequeño juego de genes expresados a altos niveles en la parte más baja, son los tumores de pacientes que sufrieron metástasis a distancia. Hay un gran juego de genes que expresan altos niveles, y un juego menor que expresa bajos niveles. El juego de más expresión génica

en los tumores es de mal pronóstico, porque estas pacientes tenían un alto riesgo de sufrir metástasis a distancia. Muchos de estos genes codifican proteínas que juegan un rol en la proliferación celular, así que si estudiamos los patrones de expresión de genes en cáncer mamario, po-



**Cuadro 13**



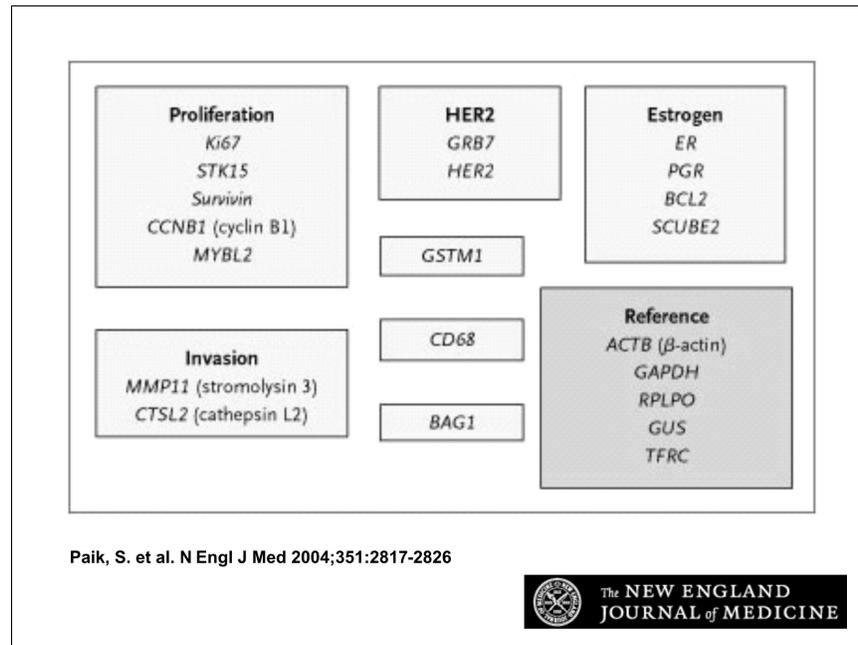
Cuadro 14

demos identificar 70 perfiles asociados con pronósticos. Basados en los perfiles, discriminamos un perfil de mal pronóstico y otro de buen pronóstico. El perfil de buen pronóstico contiene muchos genes que juegan un rol en la proliferación, pero también otros genes que, por ejemplo, juegan un rol en el desarrollo de metástasis a distancia. En este tipo de clasificación supervisada hay que ser cauteloso porque hicimos 22.000 pruebas. Al hacer 22.000 pruebas estadísticas existe el riesgo de encontrar algo al azar, simplemente porque estamos haciendo tantísimas pruebas. Esta es la razón por la cual se hacen cientos de perfiles de expresión génica. Es fundamental validar lo que hemos encontrado, hasta ahora, un grupo independiente de tumores o de pacientes y validar si el hallazgo era real y no simplemente el resultado del azar.

Es lo que hicimos con una serie de 295 tumores; ya les mostré el cúmulo no supervisado (Cuadro 13). La clasificación supervisada para el perfil de 70 genes. En las curvas de probabilidad de metástasis, la curva superior corresponde a las pacientes con un buen pronóstico en su perfil, y la curva inferior indica un tumor con mal pronóstico. Como pueden ver, para la supervivencia

global a 10 años, la tasa de supervivencia para pacientes con un buen perfil pronóstico es más del 95%. Este tipo de pruebas podría ayudar en la identificación de pacientes que tienen un riesgo tan bajo de morir de cáncer mamario, que sin peligro se pueden tratar sin usar tratamiento adyuvante sistémico. Si hay receptores de estrógeno negativos, más del 99% de esos tumores tienen un mal perfil, en pronóstico; así que en las pacientes con receptores de estrógeno negativos este perfil no ayuda. Pero en los casos de cáncer de mama con receptores de estrógeno positivo, es útil.

Esta prueba ya se está empezando a utilizar en la clínica, pero no sabemos exactamente cómo implementarla. Es muy importante para que lleguemos a entender cómo utilizar este perfil de 70 genes. El Cuadro 14 muestra el ensayo de la EORTC, el Mindact Trial Design, con ganglios negativos. Estas pacientes ya han sido *randomizadas*. Para todos estos tumores, el material congelado se recogió y envió por correo, fue un esfuerzo magnífico hecho por esta organización. El material congelado fue utilizado para hacer las pruebas de perfil de los 70 genes y los primeros resultados de este ensayo estarán disponibles



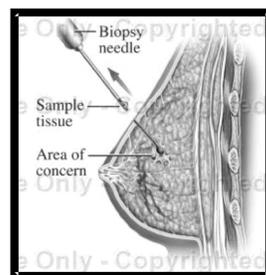
Cuadro 15

dentro de algunos años. El cuadro muestra el perfil que se sigue desarrollando y dio lugar al MammaPrint Test, que está plenamente validado, para perfiles de expresión génica en cáncer mamario.

Otro perfil génico es el que se observa en el Cuadro 15. Se puede hacer con tejido en para-

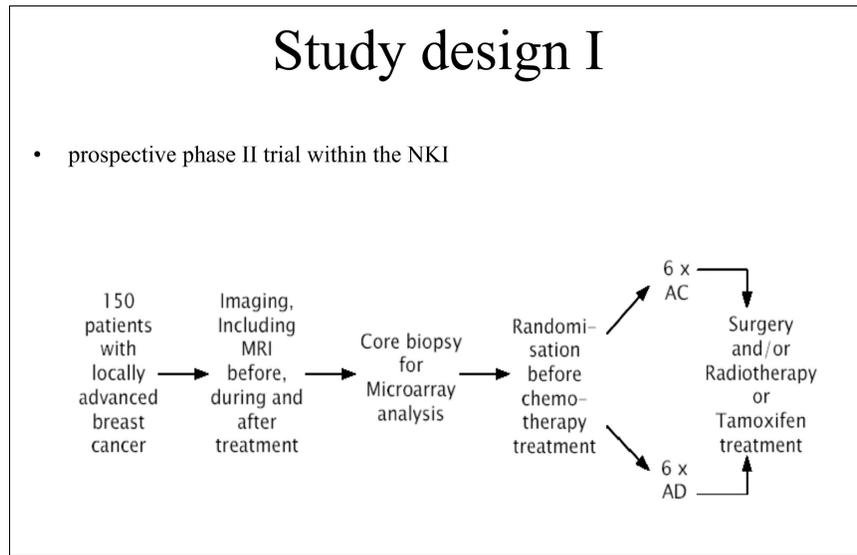
una, se saca ARN y PCR. El PCR en tiempo real muestra otra técnica para ver la cantidad de genes que son importantes en cáncer mamario. Esta prueba se desarrolló para receptores de estrógeno positivos únicamente. Igual que el MammaPrint Test, esta es una prueba que se puede utilizar para receptores de estrógeno positivos.

### • Core needle biopsy prior to neoadjuvant chemotherapy



- Freeze biopsy
- Isolate RNA
- Perform gene expression profiling

Cuadro 16



Cuadro 17

En el futuro, creo yo, que las investigaciones deben orientarse a cánceres mamarios con receptores de estrógeno negativos. Tenemos para esta prueba el ensayo prospectivo en evolución en Estados Unidos y otras partes del mundo también. Esto también va a arrojar resultados en los próximos años.

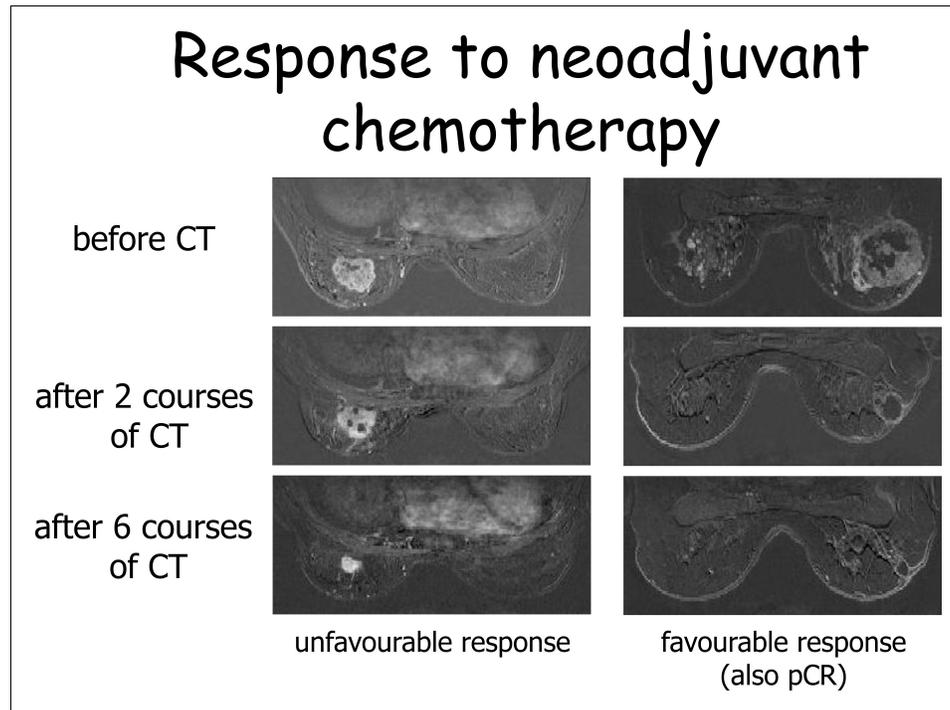
En los últimos minutos de mi presentación quisiera hablar de los perfiles de predicción; los perfiles o las pruebas que pueden predecir qué terapias funcionarán en el tumor y las que no funcionarán. Estos perfiles de respuesta terapéutica, en los distintos contextos que se están haciendo las distintas pruebas, se han hecho en estudios de tratamientos neoadyuvante, como se conoce. En una biopsia se evalúa en una paciente el perfil génico, después se trata la paciente, y la respuesta del tumor primario se utiliza para hacer la correlación de esto con el perfil de la expresión génica. También es evidente que es mucho más difícil encontrar estos perfiles de predicción, que encontrar los perfiles de pronóstico.

El Cuadro 16 muestra un ejemplo de un estudio de esta naturaleza, que se hizo en The Netherland Cancer Institute, Holanda. Se aisló el ARN de un tumor y se utilizó para el perfilado génico. En este estudio en particular las pacien-

tes fueron *randomizadas* entre dos formas de quimioterapia, para averiguar si podemos encontrar perfiles de expresiones génicas que nos podrían ayudar a decidir qué régimen de quimioterapia debe recibir tal o cual paciente (Cuadro 17).

En el Cuadro 18 la forma y la respuesta de los tumores fue evaluada, y antes de quimioterapia se hizo un ARN. En a la izquierda vemos una paciente con un gran tumor que después de 6 cursos de quimioterapia se había encogido considerablemente, pero todavía había tumor residual; es una remisión parcial. A la derecha hay también un gran tumor, después de la quimioterapia no había tumor remanente. Hemos utilizado ARN para evaluar la respuesta, pero por supuesto las pacientes fueron sometidas a cirugía y también hemos estudiado las muestras de patología del tumor. Por supuesto, cuando ya no había tumor, esto era una remisión patológica completa.

Hemos encontrado haciendo un subtipificado molecular, los tipos basal, luminal A, luminal B. Como dije al principio, los tumores basales o triples negativos (con receptores negativos, con HER2 negativo), tienen una alta chance de responder con una remisión patológica completa



Cuadro 18

a la quimioterapia. Cuando hay un cáncer basal o triple negativo y tratamos con quimioterapia existe entre 30% y 50% de factibilidad de lograr una remisión patológicamente completa. Si hay un HER2 positivo, y damos quimioterapia más trastuzumab hay más de un 50% de chance que el tumor tendrá remisión patológica completa. Esto lo sabemos, no necesitamos nuevas pruebas diagnósticas; vamos a utilizar pruebas de receptor de estrógeno y HER2.

Pero para averiguar nuevas predicciones de respuesta con clasificaciones supervisadas, del mismo modo que identificamos los perfiles de pronóstico, no se ha llegado a traducir en forma confiable y reproducible perfiles de predicción. Hemos observado esto y otros grupos del mundo han encontrado lo mismo. Creo yo que una posible explicación sería que hay una heterogeneidad en los mecanismos por los cuales los tumores se tornan resistentes a la quimioterapia o al trastuzumab, o a las terapias hormonales. Esta diversidad de mecanismos puede estar presente

en los tumores primarios antes del tratamiento. Por supuesto hay tumores que no responden a quimioterapia en forma alguna y hay otros que responden pero que se tornan resistentes; así que esta resistencia adquirida es quizá heterogénea. Por esta razón, necesitaremos estudios mucho más amplios para identificar pruebas de predicción que casi no se necesitan actualmente en la clínica para identificar perfiles de predicción en el cáncer mamario.

En cuanto al diagnóstico de procesos malignos, incluso cáncer mamario, el camino del futuro será integrar las características histopatológicas, las alteraciones genéticas. De esto no he hablado hoy, pero hay un vasto esfuerzo internacional para secuenciar el ARN de los tumores, para tener toda la secuencia del genoma de series grandes de tumores. Para conocer las alteraciones genéticas del perfil, la expresión génica, hay nuevos aspectos que se pueden evaluar. El ARN no codificador estudia el ARN mensajero que codifica proteínas. Pero hay otras formas

importantes de ARN que regulan la expresión de otras formas de ARN. También hay que conocer toda la secuencia del genoma. Hay nuevos desarrollos para poder estudiar las proteínas en forma más detallada. Integrar toda esta información en los años subsiguientes se va a tradu-

cir en nuevos enfoques de pruebas diagnósticas en tumores de pacientes con cáncer mamario.

Los perfiles de expresión génica y otras técnicas genéticas, están ayudando a hallar nuevas pruebas de pronóstico y predicción que nos ayudarán a orientar las terapias adyuvantes.